

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **61-246124**

(43)Date of publication of application : **01.11.1986**

(51)Int.Cl. **A61K 31/35**

// C07D311/30

(21)Application number : **60-089770** (71)Applicant : **YAMANOUCHI
PHARMACEUT CO LTD
OGAWARA HIROSHI**

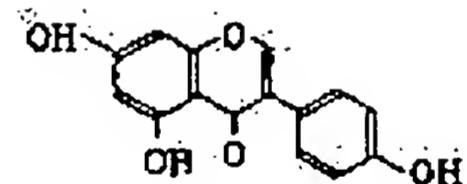
(22)Date of filing : **24.04.1985** (72)Inventor : **OGAWARA HIROSHI
WATANABE SHUNICHI**

(54) CARCINOSTATIC AGENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a carcinostatic agent containing 5,7,4'-trihydroxyisoflavone as an active component and having tumor cell proliferation inhibiting activity and DNA-synthesis inhibiting activity.

CONSTITUTION: The objective agent contains 5,7,4'-trihydroxyisoflavone (general name: genistein) as an active component. Genistein is a compound separated from a certain kind of clover (*Trifolium subterraneum L.*) and is known to have weak estrogen activity. It has been found newly that the compound is effective to inhibit the proliferation of tumor cell, the synthesis of DNA and the activity of tyrosine-specific phosphorylase. Coupled with the low acute toxicity, the compound is useful as a carcinostatic agent for the remedy of human and animal cancer, the remedy for diseases caused by the metastasis of cancer and the prevention of relapse of cancer. It is applied at a rate of usually 200W1,000mg daily in 1W4 divided doses.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑰ 公開特許公報 (A)

昭61-246124

⑯ Int.Cl.¹A 61 K 31/35
// C 07 D 311/30

識別記号

ADU

庁内整理番号

6640-4C

⑯ 公開 昭和61年(1986)11月1日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑩発明の名称 制癌剤

⑪特 願 昭60-89770

⑫出 願 昭60(1985)4月24日

⑬発明者 小河原 宏 東京都文京区湯島2-33-9

⑭発明者 渡辺 俊一 大宮市大字蓮沼869-3

⑮出願人 山之内製薬株式会社 東京都中央区日本橋本町2丁目5番地1

⑯出願人 小河原 宏 東京都文京区湯島2-33-9

⑰代理人 弁理士 藤野 清也 外1名

明細書

1. 発明の名称

制癌剤

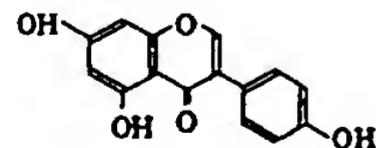
2. 特許請求の範囲

5, 7, 4'-トリヒドロキシイソフラボン(ゲニスティン)を有効成分とする制癌剤

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は式



で示される 5, 7, 4'-トリヒドロキシイソフラボン(一般名 ゲニスティン)を有効成分とする制癌剤に関する。

(従来の技術)

ゲニスティンは、ジャーナル・オブ・ザ・ケミカル・ソサエティー (Journal of the Chemical Society) 3447頁 1951年に記載されている公知化合物で

ある。同文献によれば、ゲニスティンはある種のクローバー (Trifolium subterraneum L.) から単離された化合物で、弱いエストロジエン作用を有することが報告されている。しかし、制癌作用については全く報告されていない。

(発明の作用および効果)

本発明者等は、土壤より分離されたシュードモナス属に属する微生物の発酵生産物中に制癌作用を有する物質を認め、さらに探索した結果、この物質がゲニスティンであることをつきとめ発明を完成した。

以下、本発明の化合物の制癌作用および毒性等を説明する。

①腫瘍細胞増殖阻止作用及びDNA合成阻止作用

ゲニスティンの制癌作用を、以下の実験的腫瘍細胞の増殖阻止及びDNA合成阻止試験により調べた。

(1) ラウス肉腫ウイルスによるラット形質転換細胞 (RSV-3Y1 細胞)に対する増殖阻止

試験

- (a) ヒト上皮性癌細胞 (A 431 細胞)に対する増殖阻止試験
- (b) SV 40 ウィルスによるラット形質転換細胞 (SV 40 - 3Y1 細胞)に対する増殖阻止試験
- (c) マウス肥満細胞腫 (P815 細胞)に対するDNA合成阻止試験
- (d) マウス胸腺 (EL - 4 細胞)に対するDNA合成阻止試験

試験方法および結果

上記(a), (b)および(c)の試験方法は以下の通りである。

(a) RSV - 3Y1 細胞, (b) A431 細胞または(d) SV 40 - 3Y1 細胞を 2% 牛胎児血清 (ギブコ (Gibco) 社製) 及び各種濃度のゲニステインを含むダルベッコ (Dulbecco) の MEM (日本水産㈱製) 培地中で培養した。ゲニステインの濃度は無添加, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のよび 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の 4 通りとした。1, 2, 3 および 4 日後

5% CO₂ 培養器で 24 時間培養後, [³H] チミジン (Thymidine) (アマシャム・ジャパン㈱製) を 0.1 $\mu\text{Ci}/\text{ウェル}$ 添加し, 更に 18 時間培養した。ウェルごとに細胞をグラスファイバーフィルター (ワットマン (Whatman) GF/A) 上に取り, フィルターは乾燥後シンチレーションバイアルに入れ, トルエンシンチレーターを加え, 液体シンチレーションカウンターで [³H] チミジン (Thymidine) の取り込みを測定した。結果を第 2 図に示す。

第 2 図に見られるように, 培養液中に 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のゲニステインが存在すると P815 細胞では約 50% チミジンの取り込みが抑えられ, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度では P815 細胞, EL - 4 細胞とともにチミジンの取り込みが完全に阻止される。

② チロシン特異的リン酸化酵素活性の阻止作用

ゲニステインの各種酵素活性阻止作用を, 以下の 3 種 (a~c) のチロシン特異的プロテインキナーゼ, 2 種 (d, e) のセリン, スレオニンのプロテインキナーゼである。

トリバンブルーを用いて 1 ディッシュ中の生細胞数を計測した。結果を第 1 図 (i) ~ (iv) に示す。

第 1 図にみられるようにゲニステインは 1 ~ 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度の添加量で細胞の増殖阻止作用が認められ, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では顕著な増殖阻止作用を示す。

上記(d)および(e)の試験方法は以下の通りである。

(c) P815 細胞または(d) EL - 4 細胞を 2% の 56°C 30 分間非効化処理牛胎児血清 (フロー ラボラトリーズ (Flow Laboratories) 社製) と 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ゲンタマイシン (エッセクス日本㈱製) を添加した RPMI 1640 培地 (日本水産㈱製) に懸濁し, 最終細胞濃度を 2×10^3 細胞/ ml とした。96 ウエル平底マイクロプレート (住友ペークライト㈱製) に, この細胞懸濁液を 200 $\mu\text{l}/\text{ウェル}$ 入れ, ゲニステインを最終濃度が, 無添加, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加えた。このプレートを 37 °C

オニンプロテインキナーゼ, 及びその他の酵素 (f~h) について測定した。

- (a) ラウス肉腫ウィルス由来 (Src 遺伝子 pp60^{src}) チロシン特異的リン酸化酵素
- (b) ヒト上皮性癌細胞増殖因子受容体 (EGF レセプター, A431 細胞) チロシン特異的リン酸化酵素
- (c) ネコ肉腫ウィルス由来 (fes 遺伝子, pp110^{fes}) チロシン特異的リン酸化酵素

- (d) c - AMP 依存性プロテインキナーゼ
- (e) ホスホリラーゼキナーゼ

- (f) ホスホジエステラーゼ

- (g) Na⁺, K⁺ - ATPase

- (h) 5' -スクレオチダーゼ

この中, (a)~(c) は癌遺伝子由来のチロシン特異的リン酸化酵素であり, (d)(e) はセリン, スレオニンのプロテインキナーゼである。

ゲニステインによるこれらの酵素活性阻止作用の測定方法および結果を次に示す。

測定方法(a) ラウス肉腫ウイルス由来 (Src 遺伝子 pp 60^{src})

チロシン特異的リン酸化酵素活性の測定法
 (エム、エス・コレット、アール、エル・エリクソン：プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユースエー 75巻 2021～2024 頁 1978年参照)

ラウス肉腫ウイルス (RSV) でトランスフォームした 3Y1 細胞 (ラット胎児腎由来線維芽細胞) を培養し、洗浄後それに RIPA バッファー [0.5% NP40, 0.1% ソディウムデオキシコレート (sodium deoxycholate), 50mM Tris-HCl pH 7.2, 1mM フェニルメチルスルホニルフルオライド (phenylmethyl sulfonyl fluoride) (PMSF), 0.15 M NaCl] を加え、0℃ 30 分間放置することにより可溶化する。これを 10万×g 20分間遠心することにより得た上清に、RSV を接種して担癌としたウサギより得た抗血清

ン、ジイ・カーベンター、エル・キング；ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー 255巻、4834～4842 頁 1980 年参照)

EGF レセプターを多量に含むことの知られているヒト上皮性癌細胞 (A431 細胞) より調整した細胞膜を酵素源として用いた。50 μl 中に、20mM Pipes-NaOH pH 7.2, 10 mM MgCl₂, 3 mM MnCl₂, 1 mM DTT, 10 μM [γ -³²P] ATP (2 mCi/mmol), A431 細胞細胞膜 (タンパク量 10 μg) 及びグニステインを含む反応液を 5 分間反応したのち、反応を停止させ、反応液を 8% ポリアクリルアミドゲル電気泳動-オートラジオグラフィで解析して、分子量 17 万の EGF レセプターのリン酸化の有無を調べる。さらにその EGF レセプターを切り出し、液体シンチレーショングカウンターで放射能を測定することにより、リン酸化の程度を定量した。

• A431 細胞からの細胞膜調整法

を加え 0℃ で 30 分～1 時間インキュベートし、pp 60^{src} と抗体を反応させる。免疫複合物をプロテイン A-セファローズ 4B (protein A-Sepharose - 4B) (ファルマシア社製) と混合することにより集めてから RIPA バッファーで洗う。得られた pp 60^{src}-抗体-プロテイン A-セファローズ 4B 複合体を、20 mM Pipes-NaOH pH 7.2, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 10 μM [γ -³²P] ATP (2 mCi/mmol) 中で 30℃ 5 分間反応してプロテインキナーゼ反応を行った後 SDS を含む反応停止液を加え、3 分間煮沸し反応を止める。反応液を 8% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、オートラジオグラフィののち、切り出した pp 60^{src} の放射能を液体シンチレーションカウンターにより計測し、リン酸化反応を定量した。

(b) ヒト上皮性癌細胞増殖因子受容体 (EGF レセプター、A431 細胞) チロシン特異的リン酸化酵素活性の測定法 (エス・コウェ

7% 牛胎児血清 (ギブコ社製) を含むダルベッコーの MEM (日本水産㈱製) 培地で培養した A431 細胞を集め、コーベンらの方法 (スタンレイ・コーベン、ヒロシ・ウシロ、クリスタ・ストシェック、ミカエル・チンカーズ：ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー 257巻 1523-1531 頁 1982 年参照) により細胞膜小胞を調整した。

(c) ネコ肉腫ウイルス由来 (fes 遺伝子、pp 110^{fes}) チロシン特異的リン酸化酵素活性の測定法 (アール・エー・フェルドマン、ティー・ハナフサ、エッチ・ハナフサ；セル 22巻 757～765 頁 1980 年参照)

ネコ肉腫ウイルスによりトランスフォームしたラット 3Y1 細胞、及びこの細胞を接種して担癌としたフィッシャーラットの血清を用いて、pp 60^{src} の場合と同様にして免疫沈降した pp 110^{fes} のプロテインキナーゼ活性を測定した。

(d) c - AMP 依存性プロテインキナーゼの活性測定法

ウサギ筋肉より調整した c - AMP 依存性プロテインキナーゼ (タンパク量 4 μg) (シグマ (Sigma) 社製) を 50 mM Hepes - NaOH pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 4 μM [γ -³²P]ATP (2 mCi/mmol), 6 mg/ml ヒストン type II A (シグマ社製), 10 μM c - AMP 及びゲニステインを含む反応液 50 μl 中で 30°C 5 分間反応した。2 × 2 cm のワットマンロ紙 P 81 IC スポットし, ロ紙を 50 mM NaCl で 5 分間ずつ 4 回洗浄後, さらにアセトンで 5 分間洗浄し, 液体シンチレーションカウンターで放射能を計測した。

(e) ホスホリラーゼキナーゼ活性の測定法

50 μl 中に 40 mM トリス - 塩酸 (Tris - HCl) pH 7.4, 100 μM CaCl₂, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 10 μM [γ -³²P]ATP (2 mCi/mmol), 10 μg ホスホリラーゼ b (phosphorylase-b) (シグマ社製), ウサギ筋肉ホスホリラーゼキナ

は, 上清液に 1 % トリトン X - 100 5 μl, 精製水 350 μl, 2.5 % モリブデン酸アンモニウムを含む 5 N - 硫酸水溶液 50 μl を加え 20 分間放置後, 660 nm の吸光度を測定することにより定量した。

(f) Na⁺, K⁺ - ATPase 活性の測定法

50 μl 中に, 50 mM トリス - 塩酸 (Tris - HCl) pH 7.5, 60 mM NaCl, 25 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 3 mM ATP, イヌ腎臓より調整した Na⁺, K⁺ - ATPase (タンパク量 560 ng) 及びゲニステインを含む反応液を 37°C 30 分間反応後, ホスホジエステラーゼと同様にして反応の結果生じたリンを定量した。

◦ Na⁺, K⁺ - ATPase の調製

Na⁺, K⁺ - ATPase は, カワムラらの方法 (カワムラ, オータ, ナガノ; ジャーナルオブバイオケミストリー 87 卷 1327-1333 頁 1980 年参照) イヌ腎臓外臓 (outer medulla) を 50 mM イミダゾール pH 7.4, 0.25

ゼ (phosphorylase kinase) (タンパク量 2 μg) (シグマ社製) 及びゲニステインを含む反応液を 30°C 5 分間反応後, SDS を含む反応停止液を加え 100°C で 2 分間煮沸し反応をとめた。ホスホリラーゼ b のリン酸化は反応液を 8 % SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 - オートラジオグラフィ後, 切り出したホスホリラーゼ b を液体シンチレーションカウンターで測定することにより定量した。

(f) ホスホジエステラーゼ活性の測定

50 μl 中に, 50 mM トリス - 塩酸 (Tris - HCl) pH 7.5, 8 mM MgCl₂, 0.8 mM EDTA, 0.02 mM DTT, 5 mM c - AMP (シグマ社製), ウシ心臓ホスホジエステラーゼ (タンパク量 10 μg) (シグマ社製), 及びゲニステインを含む反応液を 37°C 30 分間反応する。

10 % TCA を 50 μl 加えて反応をとめ, 5,000 rpm 10 分間遠心して得た上清 90 μl を用いてリンの定量を行う。リンの呈色反応

M スクロース, 1 mM EDTA, 0.1 mM ATP を含むバッファー中でポリトロン (polytron) (キネマティカ (Kinematica) 社製) で破壊後超遠心することにより得られたミクロソーム画分を SDS で抽出することにより調製した。

(h) 5' - ヌクレオチダーゼ活性の測定法

50 μl 中に 55 mM トリス - 塩酸 (Tris - HCl) pH 8.5, 5.5 mM MgCl₂, 1.1 mM ATP, 10 mM 酒石酸ナトリウムカリウム塩, 5' - ヌクレオチダーゼ (蛇毒) (シグマ社製) 及びゲニステインを含む反応液を, 37°C 3 分間反応後, ホスホジエステラーゼと同様にして反応産物のリン酸を定量した。

結 果

ゲニステインの各酵素に対する活性阻止作用

酵素系	ID ₅₀ (μg/ml)
(a) pp60 ^{src} プロテインキナーゼ	0.8
(b) EGF レセプタープロテインキナーゼ	0.7
(c) pp110 ^{raf} プロテインキナーゼ	6.5

(d) c-AMP 依存性プロテイシキナーゼ	>100
(e) ホスホリラーゼ キナーゼ	>100
(f) ホスホジエステラーゼ	>100
(g) Na^+, K^+ -ATPase	>100
(h) 5'-ヌクレオチダーゼ	>100

ID₅₀ : 50% 阻止量

以上の結果に示されるように、ゲニステインは癌遺伝子由来のチロシン特異的リン酸化酵素活性を特異的に阻止する。

チロシン特異的リン酸化酵素は、癌細胞の増殖に関与すると考えられているから、この酵素活性の特異的阻止作用が認められたことは、ゲニステインの制癌作用を裏付けるものである。

③ C57BL/6 系マウスを用い、ゲニステインを腹腔内に注射して急性毒性を調べた。LD₅₀は 500mg/kg 以上であった。

上記腫瘍細胞増殖阻止作用、DNA 阻止作用およびチロシン特異的リン酸化酵素活性の

また、免疫療法剤としては、たとえば、クレスチン、BCG、ビシバニール、レンチナン、インターフェロン、インターロイキン等が挙げられる。これらの薬剤と併用する場合の投与量はゲニステイン 1 に対し、併用薬剤 0.001~10 程度が適当である。

ゲニステインの投与は、経口剤(錠剤、カプセル剤、液剤)あるいは非経口剤(直腸投与製剤、注射剤、ペレット)の製剤形態で行なわれる。これ等の製剤は、任意慣用の製剤用担体あるいは賦形剤を通常の方法によって配合された組成物として調製される。この際使用される担体あるいは賦形剤は、一般的に用いられるもので良く、たとえば、錠剤の場合、水、ブドウ糖、乳糖、アラビアゴム、ゼラチン、マンニトール、でん粉ベースト、マグネシウムトリシリケート、マルク、トウモロコシでん粉、グラテン、コロイドシリカ、馬鈴薯でん粉、尿素等が利用できる。また液剤は、水性または油性の懸濁液、溶液、シロップ、エリ

阻止作用の試験結果より、ゲニステインはすぐれた制癌作用を有しており、しかも急性毒性の結果も低いので、ヒトおよび動物の癌の治療、癌の転移に伴う疾患の治療および再発の予防のための制癌剤として有用である。

ゲニステインの臨床投与量は活性成分として、通常成人 1 日当たり、200~1,000mg であり、これを 1~4 回に分けて投与する。投与量は患者の状態や年令等、個々の場合に応じて適宜調節される。

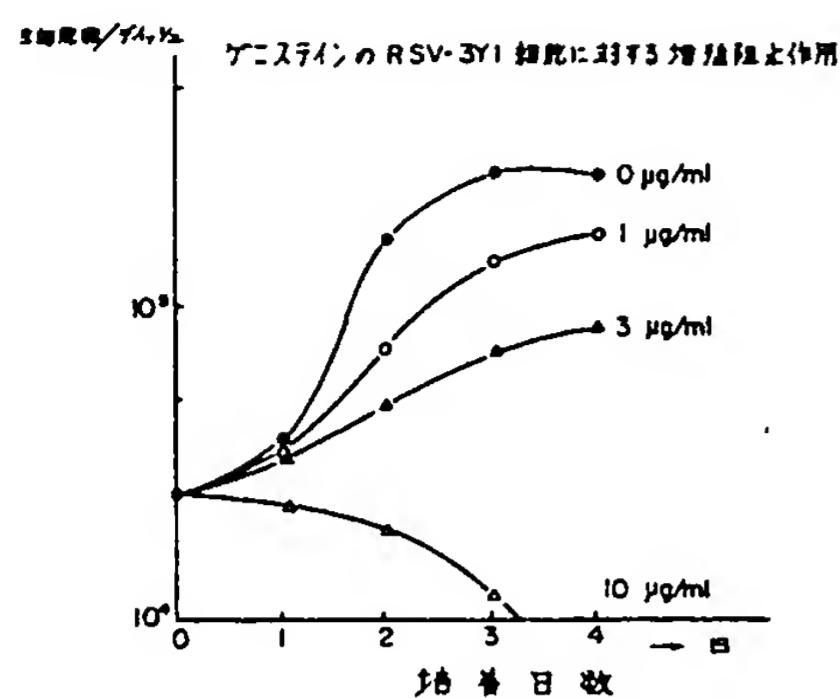
ゲニステインは単独で治療に供されるほか、他の化学療法剤あるいは免疫療法剤と併用される。併用される化学療法剤としては、サイクロホスファミド、ビンブラスチン、ビンクリスチン、アドリアマイシン、6-メルカブトブリノ、5-フルオロウラシル、マイトマイシン C、ブレオマイシン、アクラシノマイシン、ネオカルチノスタチン、シトシンアラビノシド、シスプラチン、アクチノマイシン D、ニトロソウレア系薬剤等が挙げられる。

キシリル剤であってもよく、これらは通常の方法で調製される。直腸投与のためには、坐剤用組成物として提供され、基剤としては、通常用いられるもの、たとえばポリエチレングリコール、ラノリン、カカオ脂、ウイテブル[®](ダイナミットノーベル社)等を使用できる。

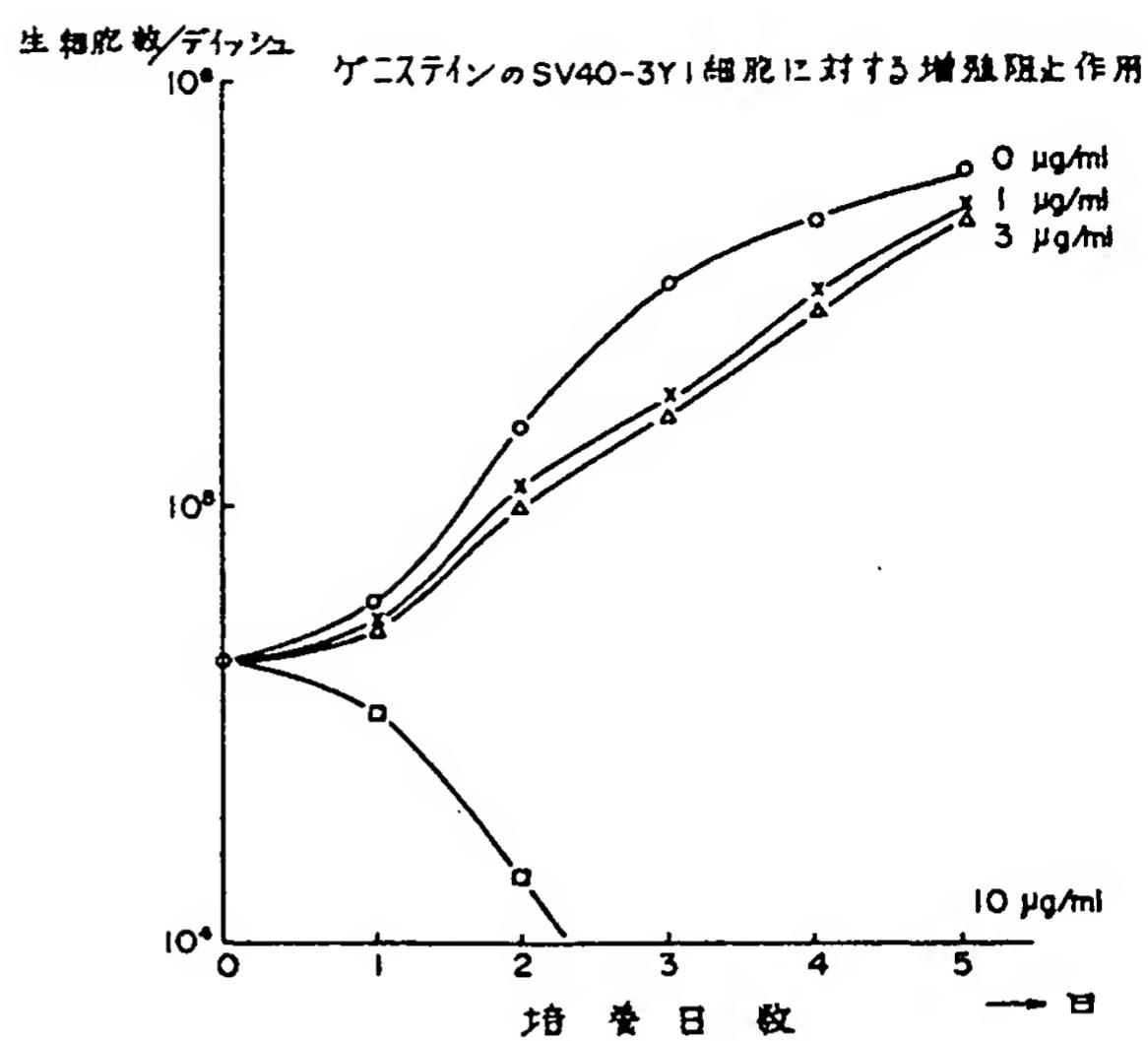
4. 図面の簡単な説明

- (1) 第 1 図 (A), (B) および (C) はゲニステインの RSV-3Y1 細胞、A431 細胞および SV40-3Y1 細胞に対する増殖阻止作用を示す。
- (2) 第 2 図はゲニステインの P815 および EL-4 細胞に対する DNA 合成阻止作用を示す。

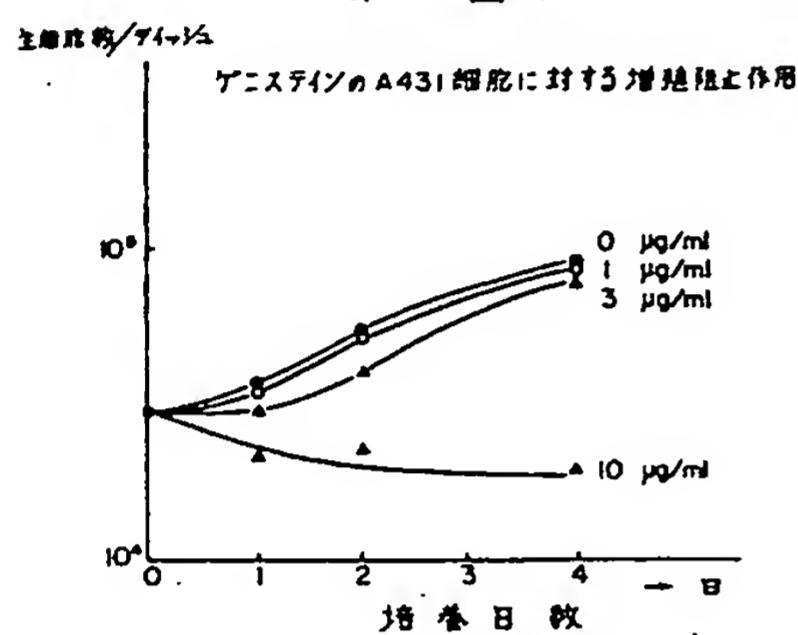
第1図(イ)



第1図(ハ)



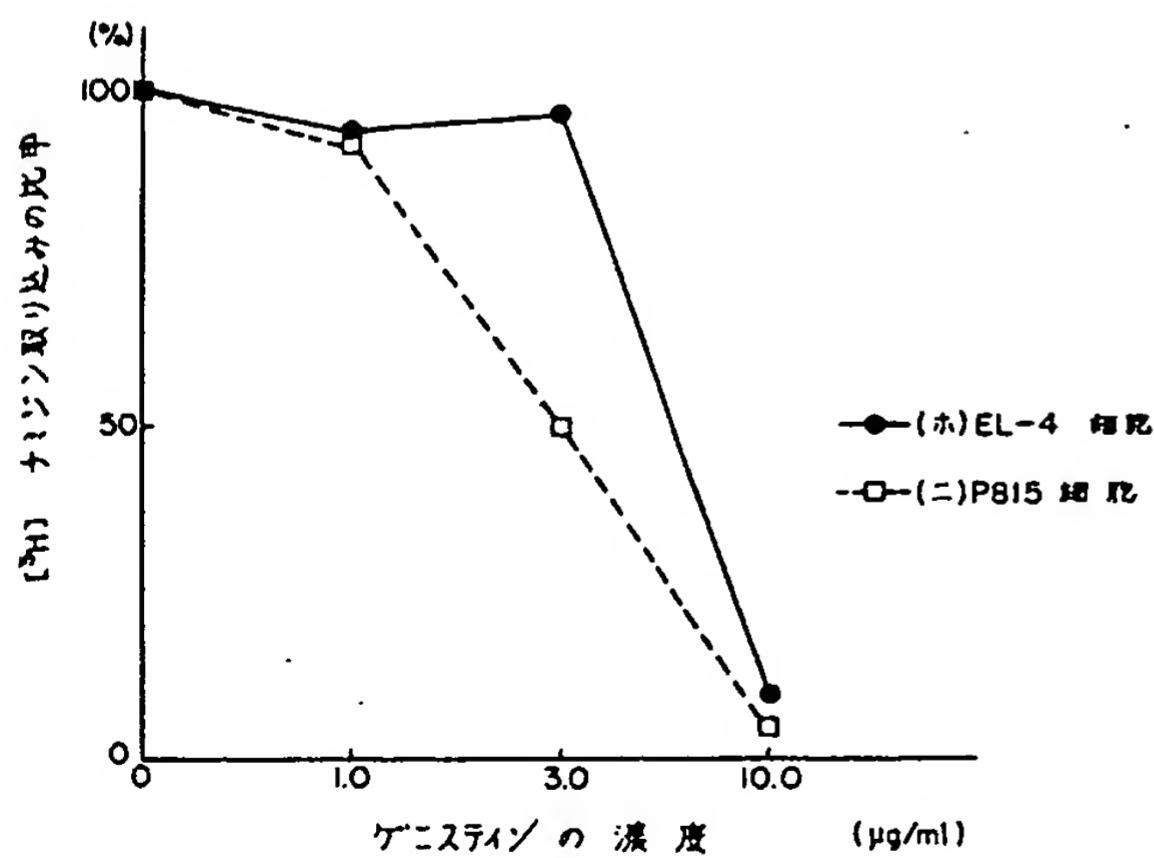
第1図(ロ)



手続補正書(自発)

昭和60年5月23日
平成元年5月23日

第2図



特許庁長官 志賀 学 殿

1. 事件の表示

昭和60年特許願第89770号

2. 発明の名称

制癌剤

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 〒103 東京都中央区日本橋本町2丁目5番地1

名称 (667) 山之内製薬株式会社

代表者 森岡茂夫(他1名)

4. 代理人

住所 〒174 東京都板橋区小豆沢1丁目1番8号

山之内製薬株式会社 特許部内

氏名 (9094) 藤野清也(他1名)



5. 補正の対象

8月25日登録の「発明の詳細な説明」の欄

6. 補正の内容

別紙の通り

方 式
審査 (杉)

- (1) 明細書第4頁第2行「(イ)～(ロ)」を「(イ)～(ハ)」に訂正する。
- (2) 明細書第6頁第3行「S r c」とあるを「src」に訂正する。
- (3) 明細書第7頁2行、「S r c」とあるを、「src」に訂正する。
- (4) 明細書第8頁第10行「反応して」を「反応させて」に訂正する。
- (5) 明細書第9頁7行「調整」とあるを「調製」に訂正する。
- (6) 同頁下から第1行、「調整」とあるを、「調製」に訂正する。
- (7) 明細書第10頁8行、「調整」とあるを「調製」に訂正する。
- (8) 明細書第11頁3行、「調整」とあるを「調製」に訂正する。
- (9) 同頁第10行「反応した。」を「反応させた。」に「口紙」を「謹紙」に訂正する。
- (10) 同頁第11行「口紙」を「謹紙」に訂正する。
- (11) 同頁第11行「で」を削除する。
- (12) 明細書第13頁10行「調整」を「調製」に訂正する。
- (13) 明細書14頁11行「3分間」を「30分間」に訂正する。